

TI Carbonylimidazole- and maleimide-terminated polyoxyalkylenes as immobilizing agents

IN Kitano, Shigeru; Myazaki, Takeshi; Kadoma, Yoshihito

PA Nippon Oils & Fats Co Ltd, Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 6 pp.

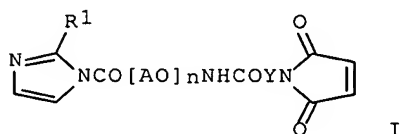
CODEN: JKXXAF

DT Patent

LA Japanese

FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 08041195	A2	19960213	JP 1994-175792	19940727
	JP 3399100	B2	20030421		
PRAI	JP 1994-175792		19940727		
GI					

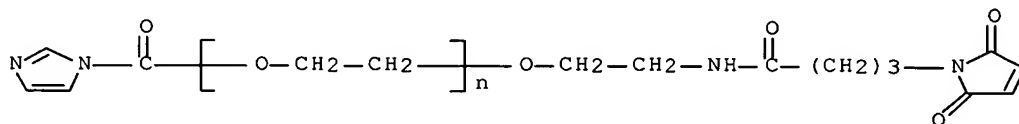


AB The title compds. (I; R1 = H, Me; AO = C2-4 oxyalkylene; Y = divalent org. residue; n = 1-1000), useful as immobilizing agents for proteins, sugars, nucleic acids, etc., are manufd. Thus, 2-aminoethoxyethanol was treated with N-(4-maleimidobutyroxy)succinimide in THF at room temp. for 5 h and then with carbonyldiimidazole at room temp. for 1 h to give 88% I [R1 = H, AO = CH2CH2O, Y = (CH2)3, n = 2] (II). A liposome comprising egg yolk lecithin, phosphatidylethanolamine, and cholesterol was treated with II for 1 day at 4.degree. and used for immobilization of horseradish peroxidase..

CN Poly(oxy-1,2-ethanediyl), .alpha.-(1H-imidazol-1-ylcarbonyl)-.omega.-[2-

[[4-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-1H-pyrrol-1-yl)-1-oxobutyl]amino]ethoxy]- (9CI)

(CA INDEX NAME)



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-41195

(43) 公開日 平成8年(1996)2月13日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 G 65/32	N Q H			
B 0 1 J 20/22		C		
C 0 7 D 403/12	2 0 7			

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平6-175792

(22) 出願日 平成6年(1994)7月27日

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72) 発明者 北野 茂

茨城県つくば市春日2-17-14

(72) 発明者 宮崎 剛

茨城県つくば市梅園2-15-5

(72) 発明者 門磨 義仁

茨城県土浦市真鍋2-8-25

(74) 代理人 弁理士 柳原 成

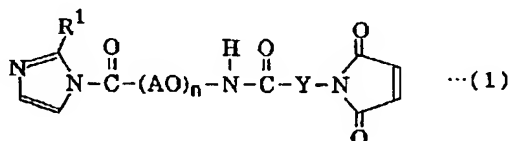
(54) 【発明の名称】 オキシアルキレン誘導体

(57) 【要約】

【目的】 ポリオキシアルキレン鎖の一方の末端にアミノ基と特異的に反応するオキシカルボニルイミダゾール基、他方の末端にチオール基と特異的に反応するマレイミド基を有し、ポリオキシアルキレン鎖をスパーサとして種々の物質を固定化できる新規な化合物を得る。

【構成】 下式で示されるオキシアルキレン誘導体。

【化1】



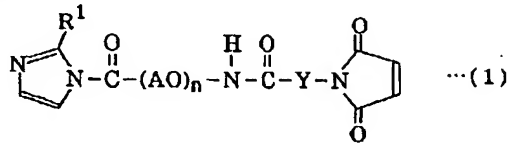
〔AOは炭素数2~4のオキシアルキレン基、nはAOの平均付加モル数で、1~1000。nが2以上の場合、AOの種類は同一でも異なってもよく、またランダム付加でも、ブロック付加でもよい。Yは2価の有機残基、R<sup>1</sup>はHまたはメチル基。〕

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(1)で示されるオキシアルキレン誘導体。

## 【化1】



【式中、AOは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。nが2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なってもよく、またランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。Yは2価の有機残基、R¹は水素原子またはメチル基を表わす。】

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は新規かつ有用なオキシアルキレン誘導体に関する。さらに詳しくは酵素、抗体等のタンパク質、糖、核酸等の生体由来物質、その他種々の機能性物質の固定化剤もしくは修飾剤、または高分子材料、医薬・農薬、色素等の原料、あるいはその他のファインケミカルの原料などとして有用なオキシアルキレン誘導体に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、タンパク質-タンパク質複合体、または薬剤-タンパク質複合体を調製する際や、アフィニティークロマトグラフィ担体へのアフィニティー物質を固定化する際に、N-(m-マレイミドベンゾイルオキシ)スクシンイミド(MBS)またはN-(4-マレイミドブチリロキシ)スクシンイミド(GMBS)などの異反応性2価試薬が広く用いられている(特公昭58-8395号、J. Immunological Methods, 122, 77-83(1988))。これらは、片末端にアミノ基と特異的に反応する活性化エステル部位、またもう一方の片末端にチオール基と特異的に反応するマレイミド基を有する異反応性2価試薬である。

【0003】 しかし上記MBS、GMBSなどの試薬を用いた架橋反応では、スパーサー部位の長さが短く、例えばシリカゲル担体上に高分子量のタンパク質などを固定化する際、タンパク質が担体から疎水的な相互作用を強く受け、変性、失活しやすいという問題点がある。またスパーサーの長さを任意に調節することができないという問題点がある。

【0004】 ところで、オキシアルキレン誘導体の中で、特にポリエチレングリコールは水溶性、非免疫原性などの特性を有し、タンパク質や薬物などの生理活性物質を架橋する架橋剤としての利用をはじめ、生物学、医学工学分野への応用が注目されている。そしてポリエチ

2

レングリコールの両端に種類の異なるタンパク質などの物質を選択的に結合させる場合には、両末端に相異なる官能基を有するポリエチレングリコール誘導体が必要となる(DE4004296(1991))。

【0005】 工業的に合成されているポリエチレングリコール誘導体としては、片末端にメトキシ基などの非反応性の基、もう一方の片末端に水酸基を有するもの、または両末端に水酸基を有するものが殆どである。しかし、水酸基は反応性に乏しいので、このようなポリエチレングリコール誘導体を上記のような架橋剤として利用するには反応性の点で満足できるものとは言い難い。

【0006】 このため、ポリエチレングリコールの両末端の水酸基を反応性の高い他の官能基に変換する試みも行われている(J. Bioact. Compat. Polym., 5(2)227-231(1990))が、この方法では未反応の水酸基末端が残る可能性があり、また反応生成物は両末端に同一の官能基を有するものと、片末端に水酸基を有するものの混合物として得られるため、カラムクロマトグラフィーなどの方法で精製する必要があり、収率や純度の面で問題がある。またこの方法では、反応性が高くしかも反応性の異なる官能基が両末端に存在するポリエチレングリコール誘導体を得ることは困難である。

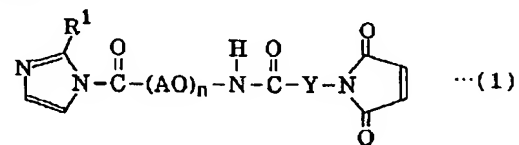
## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、(ポリ)オキシアルキレン鎖の片末端に、アミノ基と特異的に反応するオキシカルボニルイミダゾール基、またもう一方の片末端にチオール基と特異的に反応するマレイミド基を有し、しかも所望のスパーサー長および親水性を容易に得ることができ、種々の物質の固定化剤などとして利用できる新規かつ有用なオキシアルキレン誘導体を提供することである。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明は、下記一般式(1)で示されるオキシアルキレン誘導体である。

## 【化2】



【式中、AOは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。nが2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なってもよく、またランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。Yは2価の有機残基、R¹は水素原子またはメチル基を表わす。】

【0009】 本発明において、「(ポリ)オキシアルキレン」は、nが1のオキシアルキレンまたはnが2以上のポリオキシアルキレンを意味する。

3

【0010】一般式(1)においてAOで表わされるオキシアルキレン基は、炭素数2~4のオキシアルキレン基であり、オキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシ-1-エチルエチレン基、オキシ-1,2-ジメチルエチレン基、オキシテトラメチレン基などがあげられる。これらのオキシアルキレン基は、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、オキセタン、1-ブテンオキシド、2-ブテンオキシド、テトラヒドロフランなどのアルキレンオキシドを開環付加重合させた基である。

【0011】一般式(1)のnは1~1000の正数である。本発明のオキシアルキレン誘導体を、後述するように2官能性架橋剤として用い、種々の物質の固定化剤として用いる場合は、nの数を調節することにより、スパーサーの長さを任意に調節することができる。

【0012】nが2以上の場合、オキシアルキレン基の種類は同一のものでも、異なるものでもよい。後者の場合、ランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。オキシアルキレン基の種類が異なるものとしては、例えばオキシエチレン基とオキシプロピレン基とがランダム状に付加したもの、ポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンのようにブロック状に付加したもの、またはポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレン/ポリオキシエチレンのようにブロック状に付加したものなどがあげられる。

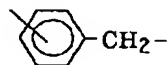
【0013】親水性を付与する場合、AOとしてはエチレンオキシドが単独で付加したものが好ましく、この場合、nが10以上のものが好ましい。また種類の異なるアルキレンオキシドが付加している場合、エチレンオキシドが20モル%以上、好ましくは50モル%以上付加しているのが望ましい。ポリオキシアルキレン鎖に親油性を付与する場合はエチレンオキシド以外の付加モル数を多くする。

【0014】一般式(1)においてYで表わされる2価の有機残基としては、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、メチルエチレン基等の炭素数1~6のアルキレン基；フェニレン基などがあげられる。その他にも下記式で表わされるようなアリーラル

4

ルキレン基など、炭素数が7~9の2価の有機残基があげられる。

【化3】



【0015】一般式(1)で表わされるオキシアルキレン誘導体は、例えば $\alpha$ -ヒドロ- $\omega$ -アミノ-ポリ(オキシアルキレン)およびアミノ基と特異的に反応するマレイミド誘導体を反応させて $\alpha$ -ヒドロ- $\omega$ -アミノ-ポリ(オキシアルキレン)のアミノ基末端をマレイミド化した後、この反応生成物にカルボニルジイミダゾールまたはその誘導体を反応させることにより製造することができる。

【0016】上記製造方法において使用するマレイミド誘導体としては、N-(4-マレイミドブチロキシ)スクシンイミド(GMBS)、N-(m-マレイミドベンゾイルオキシ)スクシンイミド(MBS)、N-(6-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミドなどがあげられる。

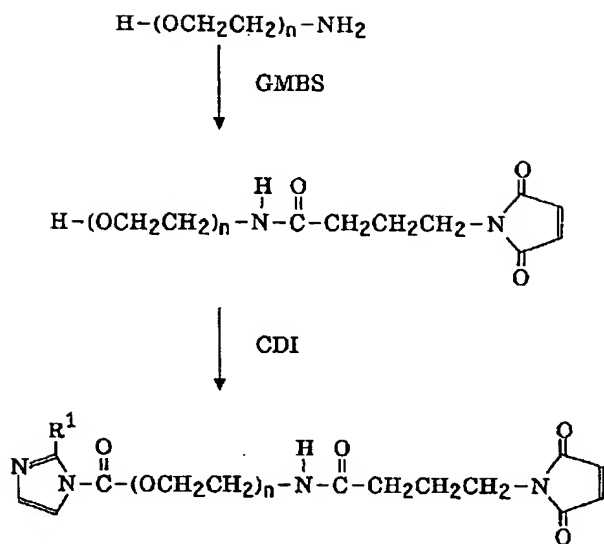
【0017】上記の反応は、いずれのステップも無溶媒で、あるいはベンゼン、トルエン、キシレン、クロロホルム、塩化メチレン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、酢酸エチルなどの有機溶媒中において、-120~+160℃、好ましくは-10~+60℃で、1分間~100時間、好ましくは10分間~12時間攪拌することにより、容易に行うことができる。反応終了後、必要によりカラム処理、透析、限外ろ過、ゲルろ過、吸着剤処理、再沈殿などの方法により単離・精製することができる。

【0018】 $\alpha$ -ヒドロ- $\omega$ -アミノ-ポリ(オキシアルキレン)として $\alpha$ -ヒドロ- $\omega$ -アミノ-ポリ(オキシエチレン)、マレイミド誘導体としてN-(4-マレイミドブチロキシ)スクシンイミド(GMBS)を用いた場合の反応式を次式(2)に示す。式中、nおよびR'は前記と同じものを示す。またCDIはカルボニルジイミダゾールまたはその誘導体を示す。

【化4】

5

6



…(2)

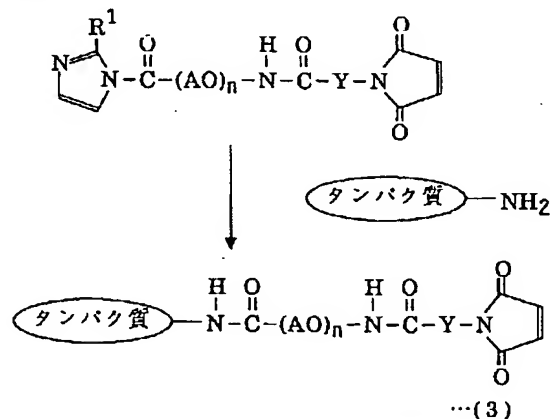
【0019】本発明のオキシアルキレン誘導体は、一般式(1)に示されているように、片末端にオキシカルボニルイミダゾール基またはその誘導体、もう一方の片末端にマレイミド基を有している。オキシカルボニルイミダゾール基またはその誘導体はアミノ基、特に第1級アミノ基と特異的に反応する部位であり、マレイミド基はチオール基と特異的に反応する部位である。このように本発明のオキシアルキレン誘導体は2つの異なる反応性部位を有するため、2官能性架橋剤、例えばアミノ基を有する物質またはチオール基を有する物質の固定化剤もしくは修飾剤として利用することができる。そしてこのように利用することにより、さまざまな機能性複合体を形成することができる。なおオキシカルボニルイミダゾール基またはその誘導体もチオール基と反応するが、マレイミド基に比べると反応性は小さいので、チオール基のほとんどがマレイミド基と反応する。

【0020】本発明のオキシアルキレン誘導体と反応させることができる物質はアミノ基またはチオール基を有する物質であれば特に限定されず、例えば酵素、抗体等のタンパク質；糖類、多糖類、核酸等の生体由来物質；医薬、農薬、色素等の機能性物質などがあげられる。これらの他にもシランカップリング剤などによりアミノ基またはチオール基を導入したガラス、シリカゲル、アルミナ等の無機材料；アミノ基、チオール基を有する合成高分子；あるいは細胞、リボソーム、マイクロソフェアなどがあげられる。機能性物質および担体を本発明の

オキシアルキレン誘導体と反応させると、(ポリ)オキシアルキレン鎖をスパーサーとして機能性物質を担体に固定化することができる。

【0021】本発明のオキシアルキレン誘導体とアミノ基を有する機能性物質、例えばタンパク質との反応を模式的に示すと次式(3)のようになる。式中、AO、n、YおよびR<sup>1</sup>は前記と同じものを示す。

【化5】

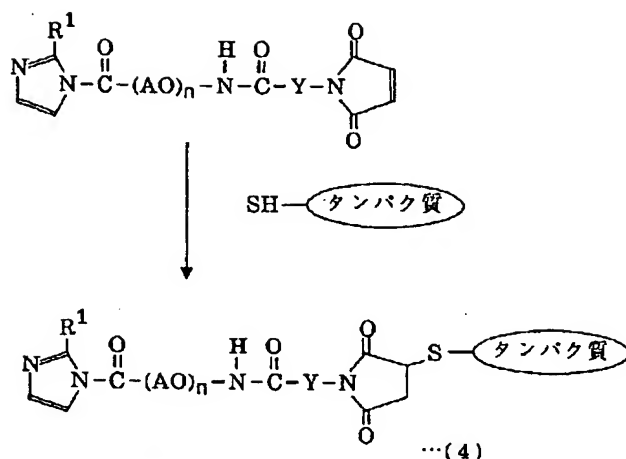


【0022】またチオール基を有する機能性物質、例えばタンパク質との反応を模式的に示すと次式(4)のようになる。式中、AO、n、YおよびR<sup>1</sup>は前記と同じものを示す。

【化6】

7

8



【0023】本発明のオキシアルキレン誘導体とアミノ基またはチオール基を有する物質との反応は、緩衝液、生理的食塩水などの水系溶媒、またはエタノール、メタノール、アセトニトリル、1, 4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジメチルアセチルアミドなどの有機溶媒、あるいはこれらの有機溶媒と前記水系溶媒との混合溶媒中において、 $-120 \sim +140^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0 \sim 60^{\circ}\text{C}$ で、30秒間～168時間、好ましくは30分間～24時間反応させることにより容易に行うことができる。

【0024】本発明のオキシアルキレン誘導体は上記のような固定化剤もしくは修飾剤の他にも、高分子材料、医薬、農薬、色素等の原料、あるいはその他のファインケミカルの原料などとしても利用することができる。

【0025】

【発明の効果】本発明のオキシアルキレン誘導体は新規かつ有用である。本発明のオキシアルキレン誘導体をアミノ基またはチオール基を有する物質の固定化剤として\*

\*用いることにより、(ポリ)オキシアルキレン鎖をスベラーとして機能性物質を担体に固定化することができる。

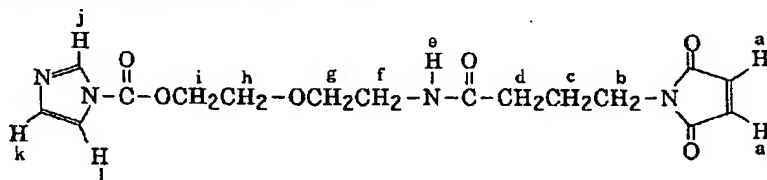
【0026】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 20 実施例1

テトラヒドロフラン50ml中に2-アミノエトキシエタノール1.0g (9.5mmol) およびN-(4-マレイミドブチリロキシ) スクシンイミド2.7g (9.5mmol) を加え、室温で5時間攪拌した。さらにカルボニルジイミダゾール1.5g (9.5mmol) を加え、室温で1時間攪拌した後、展開溶媒として酢酸エチル/ヘキサン (V/V=1/1) 混合溶媒を用いたシリカゲルカラムにより単離・精製し、下式(5)で示される目的物を得た (収率88%)。

【化7】



…(5)

【0027】得られた化合物の $^1\text{H-NMR}$ の分析結果は次の通りである。

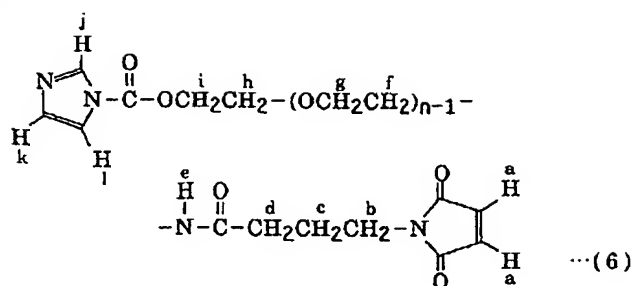
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) : 1.98 (c; 2H), 2.11 (d; 2H), 3.38~3.97 (b, f, g, h; 約8H), 4.60 (i; 2H), 6.78 (a; 2H), 7.05 (k; 1H), 7.42 (l; 1H), 8.19 (j; 1H)

#### 【0028】実施例2

テトラヒドロフラン50ml中に $\alpha$ -ヒドロ- $\omega$ -アミ

ノ-ポリ(オキシエチレン) 1.0g (0.5mmol) およびN-(4-マレイミドブチリロキシ) スクシンイミド0.14g (0.5mmol) を加え、室温で10時間攪拌した。さらにカルボニルジイミダゾール0.08g (0.5mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。次に、反応液を500mlのジエチルエーテルに滴下して再沈した後真空乾燥し、下式(6)で示される目的物を得た (収率85%)。

【化8】



$n=45$

【0029】得られた化合物の $^1\text{H-NMR}$ の分析結果は次の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) : 1.97 (c ; 2H), 2.11 (d ; 2H), 3.38~3.97 (b, f, g, h ; 約180H), 4.60 (i ; 2H), 6.78 (a ; 2H), 7.05 (k ; 1H), 7.42 (l ; 1H), 8.19 (j ; 1H)

【0030】参考例1

膜組成分として卵黄レシチン、ホスファチジルエタノールアミンおよびコレステロールの各々等モル量からなる小さな一枚膜リポソームを、固形分量として10%含むリン酸緩衝液 (pH=7.5) 中に、実施例1で得られたオキシアルキレン誘導体10mgを加え、4℃で1昼夜緩やかに攪拌し、オキシアルキレン誘導体をリポソ-

ームに結合させた。

【0031】反応終了後、Sephadex G-50を用いてゲルろ過し、得られたリポソーム分画に、西洋山葵ペルオキシダーゼ (以下、HRPと略す) 100 $\mu\text{g}$ を加え、4℃で24時間振とうし、HRPをオキシエチレン基の先端に固定化した。反応終了後、再度Sephadex G-50を用いてゲルろ過を行い、リポソーム分画を分取した。これに、HRPの基質である1, 2-フェニレンジアミン溶液 (10mmol/l) 100 $\mu\text{l}$ を加え、30℃で10分間インキュベートし、さらに0.1N硫酸10mlを加えたところ、強い褐色の呈色が見られた。この結果から、実施例1で得られたオキシアルキレン誘導体を用いることにより、リポソーム表面にHRPを容易に固定化できることが分る。